

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. N. Henning

Vergleichende Untersuchungen von LDH-Isoenzymbestimmungsmethoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

1968

vorgelegt
von
Gunter Thuss
aus
Zwickau/Sachsen

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Wetterer

Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 5.2.1968

Das Ärztliche Laboratorium

ZEITSCHRIFT FÜR DEN LABORATORIUMSARZT UND DIE ÄRZTLICHE PRAXIS

SCHRIFTFLEITER: G.-W. ORTH, GIESSEN

UNTER STÄNDIGER MITARBEIT VON O. FENNER, HAMBURG

12. Jahrgang

April 1966

Heft 4

Ärztl. Lab. 12: 97–108 (1966)

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg

(Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Vergleichende Untersuchungen von LDH-Isoenzymbestimmungsmethoden

Von

H. WÜST und G. THUSS*

Die Erhöhung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum ist diagnostisch vieldeutig. Pathologische Aktivität wird bei Kranken mit Herz- und Lungeninfarkt, Myokarditis, Leberkrankheiten, perniziöser und haemolytischer Anämie, malignen Tumoren, bestimmten Blutkrankheiten und Niereninsuffizienz gefunden (1, 10). Durch Bestimmung der LDH-Isoenzyme gelingt es, nähere Aussagen über die Organherkunft erhöhter Serum-LDH zu erhalten.

Obwohl in mehreren Arbeiten übereinstimmend auf die klinisch-diagnostische Bedeutung von LDH-Isoenzymbestimmungen hingewiesen wurde (7, 9, 11, 18, 22), haben Isoenzymmethoden bisher nur in speziell interessierten Laboratorien Eingang gefunden. Methodische Schwierigkeiten dürften hierfür wesentlich verantwortlich sein.

Wir verstehen unter Isoenzymen Fermente mit ähnlicher Substratspezifität, aber unterschiedlichen Proteinstrukturen (12). Die typische Methode zu ihrer Differenzierung ist die Elektrophorese (9, 13, 16, 20). Auch durch Chromatographie (11), durch fraktionierte Hitzeinaktivierung (7, 21, 22) und mit immunologischen Methoden (6) gelingt es, die einzelnen Isoenzymfraktionen zu trennen.

Diese methodisch so unterschiedlichen Verfahren sind auch in ihren Ergebnissen und ihrem Aussagewert nicht einheitlich zu beurteilen. Es erhebt sich die Frage, welche Methoden den Besonderheiten der Klinik am ehesten gerecht werden. Eine Methode sollte in erster Linie aussagekräftig, schnell und einfach ausführbar, möglichst aber auch wirtschaftlich sein.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden verschiedene typische LDH-Isoenzymmethoden vergleichend untersucht, nämlich die Enzymelektrophorese [modifiziert nach Wieme (17)], die Sephadex-Schnellmethode, ein modifiziertes chromatographisches Verfahren nach Hess und Walter, eingeführt als Biochemica-Test-Combination-Boehringer (3), die Bestimmung der α -Hydroxybutyrat-dehydro-

* D 29

genase (HBDH), eingeführt als Merckotest® (4), die thermische LDH-Inaktivierung bei 60° C nach Bell (5) und die fraktionierte thermische LDH-Inaktivierung bei 56° C und 65° C nach der eigenen Methode (22).

Methodik

Bestimmung der Gesamt-Laktatdehydrogenase (Gesamt-LDH)

Die Gesamt-LDH-Aktivität wurde im optischen Test mit NADH_2 (= DPNH) gemessen (modifiziert nach Biochemica-Test Combination-Boehringer). Die Aktivitätsangaben erfolgten in mU/ml, die eigenen Normwerte lagen unter 200 mU/ml.

Enzymelektrophorese [modifiziert nach Wieme (17)]

Prinzip: Die im Serumprotein wandernden Isoenzyme werden in Agargel auf Objektträgern in einer Elektrophoresekammer (28 mAmpere, ca. 280 Volt) in der Kälte getrennt. Anschließend wird eine zweite Agarplatte, die Substrat (Natriumpyruvat) und NADH_2 enthält, auf die Agarschicht gelegt. Durch Diffusion kommt es an den isoenzymhaltigen Stellen zum Substratumsatz. Der NADH_2 -Verbrauch, ein Maß für die Enzymaktivität, kann durch direkte Messung bei 366 nm und Registrierung mit einem Extinktionsschreiber bestimmt werden.

Sephadex-Schnellmethode mit Biochemica-Test-Combination-Boehringer (3)

Prinzip: Die schnellwandernden LDH-Isoenzyme werden an eine Sephadex-Suspension adsorbiert. Durch Bestimmung der LDH vor und nach Adsorption können adsorbierte und nicht adsorbierte Anteile berechnet werden. Einzelheiten s. Arbeitsanweisung der Fa. Boehringer¹.

Bestimmung der α -Hydroxybutyrat-dehydrogenase (HBDH) mit Merckotest® (4)

Prinzip: Die Enzymaktivitäten von LDH und, unter Verwendung von α -Hydroxybuttersäure als Substrat, von HBDH werden im optischen Test nach Warburg gemessen und der Quotient $\frac{\text{HBDH}}{\text{LDH}}$ gebildet. Einzelheiten s. Arbeitsanweisung der Fa. Merck².

Thermische Inaktivierung nach Bell (5)

Prinzip: 1:1 mit Phosphatpuffer verdünntes Serum wird 60 Min. bei 60° C inkubiert. Nach Bestimmung der LDH-Aktivität in der Serumverdünnung bei 25° C und im Ansatz nach Inkubation kann der thermisch stabile Anteil in Prozent berechnet werden. Einzelheiten s. Bell (5).

Thermische Inaktivierung nach eigener Methode (22)

Prinzip: 1:1 mit Phosphatpuffer verdünntes Serum wird 30 Min. bei 56° C und 65° C inkubiert. Nach Bestimmung der Gesamt-LDH im Ansatz bei 25° C und Messung der Restaktivität nach Inkubation können drei Fraktionen erfaßt werden:

Thermisch stabile Fraktion (vorwiegend LDH_1) = stabil bei 65° C

Thermisch labile Fraktion (vorwiegend LDH_5) = labil bei 56° C

Thermisch indifferente Fraktion (vorwiegend LDH_{2-4}) = stabil bei 56° C
= labil bei 65° C

Ergebnisse

Es wurden im Serum von 45 Patienten und 5 gesunden Blutspendern gleichzeitig die vorstehend beschriebenen 5 LDH-Isoenzymbestimmungen ausgeführt, insgesamt 250 Einzeluntersuchungen.

Enzymelektrophorese

Die Befunde der Agar-Enzymelektrophorese, mit der die einzelnen Isoenzymfraktionen deutlich differenzierbar sind, dienen als Vergleichswerte für die anderen

¹ Fa. Boehringer & Soehne, 6800 Mannheim-Waldhof

² Fa. E. Merck, 6100 Darmstadt

Tab. 1. Mittlere prozentuale LDH-Isoenzymverteilung im Normalserum

	n	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
eigene Fälle	5	25,3 (18,6–30,7)	41,0 (38,6–44,3)	20,9 (14,8–26,3)	9,2 (4,9–12,9)	3,7 (0,0–6,1)
Angaben von Wieme (17)	11	23,2	47,5	18,5	7,5	3,2

Methoden. Die LDH-Isoenzymverteilung beim Gesunden, verglichen mit den Angaben von Wieme (17), zeigt Tab. 1. Die Ergebnisse stimmen gut überein. Es lassen sich 5 Isoenzymfraktionen nachweisen, wobei allerdings die LDH₅ oft nur eben angedeutet darstellbar ist. Nach unseren Erfahrungen trifft dies besonders dann zu, wenn der pH-Wert im Agar zu hoch ist. Vielleicht ist das verschiedentlich mitgeteilte völlige Fehlen der langsamen Fraktion im Normalserum dadurch zu erklären. Etwa 25 % der Normalaktivität des Serums besteht aus LDH₁, stärkste Fraktion ist mit 40–50 % die LDH₂, in der Reihenfolge LDH₃ (etwa 20 %), LDH₄ (etwa 10 %) und LDH₅ (< 5 %) nimmt die Aktivität der restlichen Fraktionen dann ab.

Unter pathologischen Bedingungen kommt es mit dem Anstieg der Gesamt-LDH auch zu Veränderungen der Isoenzymverteilung. Versucht man, das unterschiedliche Isoenzymverhalten in einer zusammenfassenden Gegenüberstellung zu ordnen, so ergeben sich folgende krankheitsabhängige Reaktionstypen (Isoenzymmuster):

Herzmuskeltyp: Die LDH₁ (> 40 %) und die LDH₂ (30–40 %) sind stark erhöht, die übrigen Fraktionen fallen progredient ab.

Lebertyp: Die LDH₅ ist deutlich (> 10 %) bis stark (> 30 %) erhöht, die übrigen Fraktionen sind relativ wenig verändert.

Tumortyp: Die mittelschnell wandernden Fraktionen (LDH_{2–4}) sind bevorzugt deutlich bis stark erhöht, wobei jedes der Isoenzyme (meist die LDH₂) den stärksten Anteil haben kann.

Mischtyp: Es besteht keine eindeutige Zuordnung in die beschriebenen 3 Typen. So kann es z. B. zu einem Anstieg sowohl der mittelschnellen Fraktionen als auch der LDH₁ oder zur Erhöhung aller Fraktionen kommen. Mischtypen beobachteten wir bei Niereninsuffizienzen, schwerer Herzinsuffizienz und Polycythämie.

Die beschriebenen Reaktionstypen sind weitgehend krankheitstypisch, aber nicht krankheitsspezifisch. Die Erfahrung lehrt, daß bei Vorliegen dieser Isoenzymverteilungen eine Anzahl differentialdiagnostischer Erwägungen notwendig sind, die wir gegenwärtig noch nicht vollständig übersehen:

Der Herzmuskeltyp findet sich regelmäßig beim Herzinfarkt, aber auch bei der hämolytischen und perniziösen Anämie und bei speziellen Tumoren, wie bei Seminomen und Teratomen (23).

Der Lebertyp ist am ausgeprägtesten bei der akuten und chronisch-rezidivierenden Hepatitis, kann aber auch beim Coma hepaticum, bei einem Teil von Tumoren mit Lebermetastasen sowie bei schwerer Leberstauung beobachtet werden.

Für die Diagnose *Tumortyp* ist zunächst Voraussetzung, daß eine pathologische, d. h. über die Norm erhöhte Gesamt-LDH-Aktivität im Serum vorliegt, da die Isoenzymverteilung beim Gesunden dem Tumortyp weitgehend entspricht. Der Tumortyp ist nicht auf spezielle maligne Tumoren beschränkt. Das ihm ent-

sprechende Isoenzymmuster findet sich sowohl bei soliden Karzinomen und Sarkomen als auch bei proliferativen Systemkrankheiten (Lymphogranulomatose, Myelosen, Lymphadenosen u. a.). Eine Sonderstellung unter den malignen Tumoren nehmen, soweit bis heute bekannt ist, die Seminome und Teratome sowie die Dysgerminome des Ovars ein (23), sie bewirken im Serum ein dem Herzmuskeltyp ähnliches Isoenzymmuster. Eine zusammenfassende Darstellung unserer Ergebnisse zeigt Tab. 2.

Tab. 2. *Mittlere prozentuale LDH-Isoenzymverteilung bei verschiedenen Krankheiten (50 Fälle)*

	n	Gesamt-LDH-Aktivitätsbereich (mU)	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
Normalseren	5	100 – 164	25,3	41,0	20,9	9,2	3,7
Hepatitis	4	227 – 400	13,3	23,0	13,2	9,6	40,9
Coma hepaticum	2	583 – 1146	19,0	19,5	18,5	14,8	28,2
Herzinsuffizienz mit Leberstauung	3	223 – 410	27,7	30,4	18,4	8,7	14,8
Leberrcirrhose	3	209 – 237	24,3	37,1	21,2	9,2	8,2
Maligne Tumoren	13	209 – 2440	20,2	30,8	28,2	13,4	7,4
System- und Blutkrankheiten	6	218 – 373	25,9	39,8	22,7	8,9	2,7
Herzinfarkt	4	255 – 364	42,3	33,4	15,4	5,1	3,8
Niereninsuffizienz	7	228 – 782	26,3	28,3	25,9	13,9	5,6
Hämolytische Anämie, Polycythämie	3	237 – 437	33,7	36,1	18,8	7,6	3,8

Sephadex-Schnellmethode

Die Adsorptionsmethode mit Sephadex trennt die Isoenzyme in zwei Fraktionen. Der Vergleich mit den elektrophoretisch gewonnenen Werten macht deutlich, daß mit dem adsorbierten Anteil die Summe von LDH₁ und LDH₂ erfaßt wird. Der adsorbierte Anteil und die errechneten Mittelwerte stimmen gut überein (Tab. 3). Demnach muß unterstellt werden, daß mit der Sephadex-Schnellmethode das Gesamt-Isoenzympektrum zwischen LDH₂ und LDH₃ getrennt wird. Die Methode erlaubt eine gute Abgrenzung des Herzmuskeltyps vom Lebertyp. Nicht möglich ist die Zuordnung von Tumor- und Mischtyp (Tab. 4). Erhöhte LDH bei Kranken mit malignen Tumoren führt oft, da die LDH₂ im adsorbierten

Tab. 3. *Vergleich Adsorptionstest / Enzymelektrophorese an 20 gleichzeitig untersuchten Seren*

	Adsorbierte Aktivität (%)	elektrophoretisch ermittelte LDH ₁ (%)	LDH ₁ + LDH ₂ (%)
Mittelwert	62,4	28,7	64,5
Bereich	28,4 – 78,8	11,7 – 45,4	25,0 – 80,5

Tab. 4. Ergebnisse mit der Sephadex-Schnellmethode

	n	berechnete LDH-Adsorption		
		< 42 % „Hepatitis“- Bereich	42–62 % Indifferenz- bereich	> 62 % „Herzinfarkt“- Bereich
Herzmuskeltyp (Herzinfarkt, Anämie, Seminom)	7	0	0	7
Lebertyp (Hepatitis, Coma hepaticum, Stauungsleber, Lebercirrhose)	11	6	3	2
Tumortyp (maligne Tumoren, Systemkrankheiten)	16	2	6	8
Mischtyp (Niereninsuffizienz, Polycythämie)	9	1	4	4

Teil miterfaßt wird, zu einem Adsorptionsverhalten wie bei Herzinfarkt, in Einzelfällen, bei Überwiegen der langsam wandernden Fraktionen, zu einem Adsorptionsverhalten wie bei Hepatitis. Nur ein geringer Teil der bei Tumoren ermittelten Werte fand sich im uncharakteristischen Indifferenzbereich (45–65 % Adsorption). Viele falschpositive Ergebnisse wurden auch bei Kranken mit Niereninsuffizienz beobachtet.

α -Hydroxybuttersäure-dehydrogenase (HBDH)-Bestimmung

Es ist bis heute nicht entschieden, ob die HBDH ein selbständiges Enzym darstellt oder den schnell wandernden Isoenzymen entspricht. Die hohe Aktivität im Herzmuskel und das ähnliche Verhalten von HBDH und LDH₁ und ₂ bei Herzinfarkt und perniziöser Anämie sprechen für die Isoenzymnatur. Erhöhte Aktivität der HBDH im Serum ist für sich allein betrachtet diagnostisch vieldeutig. Durch Kombination mit der LDH-Bestimmung und Errechnen des HBDH-LDH-Quotienten sollen weitergehende Schlüsse gezogen werden können (8, 14, 15). Die Ergebnisse (Tab. 5) zeigen, daß Isoenzymmuster vom Herzmuskel- und Lebertyp eindeutig zu trennen sind. Schwierig sind die Zuordnungen von Aktivitätssteigerungen nach dem Misch- und Tumortyp. Sie fallen zum großen Teil in den Indifferenzbereich (Quotient 0,6–0,9), zum Teil aber auch in Quotientenbereiche die typisch für Leber- und Myokardschaden sind.

Thermische Inaktivierung nach Bell

Nach den Angaben von Bell (5) gelingt eine optimale Trennung von Herzmuskel- und Leber-LDH durch thermische Inaktivierung des Serums bei 60° C über eine Stunde. Er empfiehlt den Test als eine einfache klinische Routinemethode. Mehr als 60 % Restaktivität soll für Herzinfarkt, weniger als 40 % für Hepatitis oder andere Leberschädigungen sprechen. Die eigenen Ergebnisse (Tab. 6) zeigen, daß die Trennung von Herzmuskel- und Leber-LDH gelingt, wenn man den Leberbereich bis etwa 50 % ausdehnt. Völlig indifferent und nicht zuzuordnen sind

Tab. 5. Ergebnisse der HBDH-Bestimmung

	n	ermittelter $\frac{\text{HBDH}}{\text{LDH}}$	-Quotient	
		< 0,6 „typisch“ für Leberschaden	0,6–0,9 indifferenter Bereich	> 0,9 „typisch“ für Myocardschaden
<i>Herzmuskeltyp</i> (Herzinfarkt, Anämie, Seminom)	7	0	1	6
<i>Lebertyp</i> (Hepatitis, Coma hepaticum, Stauungsleber, Lebercirrhose)	12	7	4	1
<i>Tumortyp</i> (maligne Tumoren, Systemkrankheiten)	17	3	12	2
<i>Mischtyp</i> (Niereninsuffizienz, Polycythämie)	9	2	5	2

Tab. 6. Ergebnisse der thermischen Inaktivierung bei 60° C nach Bell

	n	gemessene Restaktivität (%)	
		Mittelwert	Bereich
Herzinfarkt	4	70,7	62,7–74,9
System- und Blutkrankheiten	9	53,9	42,2–73,0
Maligne Tumoren	13	47,9	31,3–71,3
Normalseren	5	51,1	42,2–58,7
Niereninsuffizienz	7	46,6	27,9–60,6
Lebercirrhose	3	59,0	52,2–69,2
Herzinsuffizienz mit Leberstauung	3	45,0	40,8–47,7
Coma hepaticum	2	37,8	34,3–41,3
Hepatitis	4	32,5	16,0–44,0

allerdings die LDH-Erhöhen bei malignen Tumoren, Blut- und Systemkrankheiten sowie Niereninsuffizienz. Bei diesen Krankheiten reichte die Restaktivität von 31–72 %, sie überdeckt somit Leber-, Indifferenz- und Herzmuskelbereich. Vergleicht man die Ergebnisse mit den zugehörigen enzymelektrophoretischen Befunden, so wird wahrscheinlich, daß bei 60° C die LDH₁ sowie ein Teil der LDH₂, vielleicht auch geringe Mengen von LDH₃ stabil bleiben. Die Trennung des Gesamtsenzyzmusters ist besonders im Hinblick auf die Verschiebungen bei Tumoren ungünstig.

Fraktionierte thermische Inaktivierung (eigene Methode)

Die eigene Methode (22), modifiziert nach Angaben von Wróblewski und Gregory (19), erlaubt durch fraktionierte Inaktivierung der LDH bei 56° C und 65° C eine Trennung in drei Fraktionen. Der Vergleich mit der Elektrophorese

Tab. 7. Ergebnisse der fraktionierten thermischen Inaktivierung bei 56°C und 65°C im Vergleich mit den enzymelektrophoretisch gewonnenen prozentualen Mittelwerten bei verschiedenen Krankheiten

	n	thermisch			enzymelektrophoretisch ermittelte				
		stabil	indiffe- rent	labil	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
Normalseren	5	25,1	59,6	15,3	25,3	41,0	20,9	9,2	3,7
Hepatitis	4	15,6	33,7	50,7	13,3	23,0	13,2	9,6	40,9
Coma hepaticum	2	16,5	32,8	50,7	19,0	19,5	18,5	14,8	28,2
Herzinsuffizienz									
mit Leberstauung	3	25,6	50,1	24,3	27,7	30,4	18,4	8,7	14,8
Lebercirrhose	3	29,6	53,2	17,2	24,3	37,1	21,2	9,2	8,2
Maligne Tumoren	13	22,5	61,3	16,2	20,2	30,8	28,2	13,4	7,4
System- und									
Blutkrankheiten	6	26,3	59,6	14,1	25,9	39,8	22,7	8,9	2,7
Herzinfarkt	4	48,2	42,7	9,1	42,3	33,4	15,4	5,1	3,8
Niereninsuffizienz	7	24,5	57,4	18,1	26,3	28,3	25,9	13,9	5,6
Hämolytische									
Anämie,									
Polycythämie	3	37,7	50,2	12,1	33,7	36,1	18,8	7,6	3,8

(Tab. 7) ergibt eine gute Übereinstimmung der bei 65°C stabilen Fraktion mit der LDH₁. Die thermisch labile Fraktion, d. h. die bei 56°C inaktivierte LDH, besteht vorwiegend aus LDH₅. Offenbar wird aber auch ein Teil der LDH₄ mit erfaßt, da der Prozentsatz der labilen Fraktion höher ist als der Anteil der elektrophoretisch ermittelten LDH₅. Der thermisch indifferente Anteil besteht aus LDH₂, LDH₃ und Teilen der LDH₄.

Hepatitis

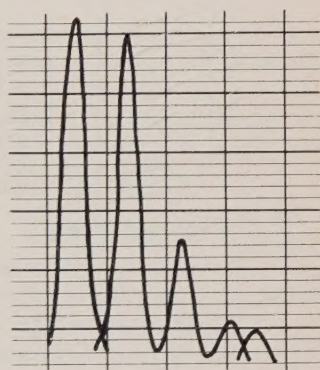


Abb. 1. Herzmuskeltyp

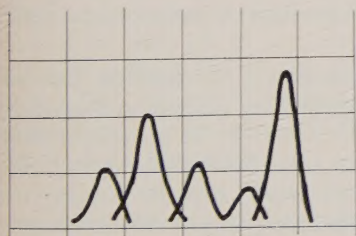


Abb. 2. Lebertyp

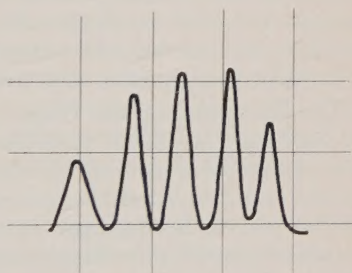


Abb. 3. Tumortyp

Die Trennung in drei Fraktionen ermöglicht es, neben dem Herzmuskel- und Lebertyp auch den Tumortyp der Serumisoenzyme zu differenzieren. Er ist durch Überwiegen der thermisch indifferenten Fraktion bei relativ niedriger LDH_1 und LDH_5 gekennzeichnet (Abb. 4). Bei einzelnen Tumoren, nicht nur beim Seminom, war der LDH_1 -Anteil relativ groß, so daß die Trennung vom Herzmuskeltyp gelegentlich Schwierigkeiten bereiten kann. Nicht eindeutig zuzuordnen sind die Isoenzymmischtypen, sie müssen auch bei dieser Methode differentialdiagnostisch berücksichtigt werden.

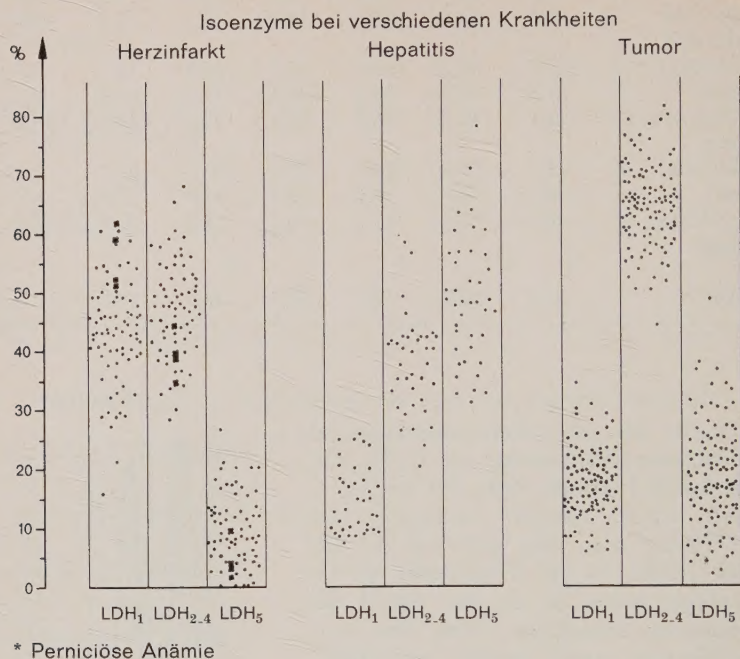


Abb. 4

Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die beschriebenen Isoenzymbestimmungsmethoden sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern. Während die Enzymelektrophorese alle fünf Isoenzymfraktionen getrennt nachzuweisen erlaubt, gelingt es mit allen anderen Verfahren immer nur, aus dem Gesamtspektrum bestimmte Teile mehr oder weniger sicher abzutrennen.

Die Beantwortung der Frage, welche Isoenzymmethoden für klinische Zwecke optimal oder zumindest brauchbar sind, hat Gesichtspunkte pathophysiologischer wie methodischer Art zu berücksichtigen. In erster Linie gilt es zu entscheiden, welche typischen Verschiebungen einzelner Isoenzyme oder Isoenzymgruppen unter pathologischen Bedingungen auftreten. Als zweites ergibt sich die Frage, mit welcher Methodik diese Veränderungen mit hinreichender Exaktheit erfaßt werden. Es kann heute als gesichert angesehen werden, daß es kein absolut organspezifisches Isoenzym gibt. Wir haben es mit einem Überwiegen einzelner, meist aber von

2 3 Fraktionen innerhalb eines Organs zu tun. Dementsprechend sind die Verschiebungen im Serum bei pathologischen LDH-Veränderungen in ihren Variationsmöglichkeiten eingeengt und beschränken sich auf einige wenige Reaktionstypen. Wir wissen heute, daß es z. B. beim Herzinfarkt ein krankheitstypisches, aber kein absolut pathognomonisches Isoenzymbild gibt. Bei Vorliegen bestimmter Isoenzymverteilungen müssen differentialdiagnostisch mehrere ursächlich zugrunde liegende Krankheiten berücksichtigt werden. Nach den eigenen erhobenen Befunden und den vorliegenden Erfahrungen anderer Autoren (7, 13, 23) lassen sich nachfolgende Isoenzymreaktionstypen (Isoenzymmuster) unterscheiden:

	<i>vorwiegend vermehrt:</i>	<i>Krankheiten:</i>
<i>Herzmuskeltyp</i>	LDH ₁ und LDH ₂	Herzinfarkt, hämolytische u. perniziöse Anämie, Seminom, Teratom, Dysgerminom (Ovar)
<i>Lebertyp</i>	LDH ₅	Hepatitis, Coma hepaticum, Stauungsleber, Lebercirrhose, Lebermetastasen
<i>Tumortyp</i>	LDH ₂ , LDH ₃ und LDH ₄	maligne Tumoren (Karzinome, Sarkome), Myelose, Lymphadenose, Retikuloze, Lymphogranulomatose
<i>Mischtyp</i>	(ohne sichere Zuordnung zu Herzmuskel-, Leber- und Tumortyp)	Polycythämie, Niereninsuffizienz

Es ist naheliegend, daß diese verschiedenen Variationsmöglichkeiten am ehesten durch die elektrophoretische Differenzierung erfaßt werden können. Diese Methodik gibt in bestimmten Fällen als einzige differentialdiagnostische Hinweise auf die unter dem Mischtyp aufgeführten Isoenzymmuster, z. B. Mitbeteiligung der Leber nach Herzinfarkt, freiwerdende Leberenzyme bei Lebermetastasierung oder Niereninsuffizienz lassen sich elektrophoretisch am sichersten erfassen.

Die übrigen geprüften Methoden sind in zwei Gruppen zu trennen, die einen spalten das Gesamtspektrum in zwei, die anderen in drei Teile. Bei der Sephadex-Methode, der HBDH-Bestimmung und bei der thermischen Inaktivierung nach *Bell* werden zwei Fraktionen bestimmt, wobei sich für die einzelnen Methoden eine uneinheitliche *Schnittführung* ergibt. Mit der Sephadex-Methode wird im adsorbierten Anteil die LDH₁ und LDH₂ erfaßt, und mit der Methode nach *Bell* die LDH₁, LDH₂ und Teile von LDH₃ als bei 60° C resistente Restaktivität gemessen. Mit der HBDH-Bestimmung ermittelt man vermutlich eine Aktivität, die diagnostisch der LDH₁ und LDH₂ entspricht, ohne daß eine exakte Isoenzymzuordnung bisher möglich ist. Mit der fraktionierten thermischen Inaktivierung bei 56° C und 65° C wird bei 65° C die LDH₁ recht exakt getrennt. Weniger deutlich gelingt dies für die LDH₅, da bei 56° C offenbar noch Teile von LDH₄ und LDH₃ miterfaßt werden. Insgesamt erlaubt letzteres Verfahren jedoch im Gegensatz zu allen sonstigen Nicht-Elektrophorese-Methoden die Differenzierung in die 3 Reaktionstypen.

Der diagnostische Aussagewert bei Verfahren mit nur 2 getrennten Isoenzymfraktionen ist, wie die vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse gezeigt hat (Tab. 8), eingeschränkt. Es ließ sich zwar bestätigen, daß Herzinfarkt und Hepatitis differenziert werden können, die Schwierigkeiten bestehen aber in der

Tab. 8. Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse verschiedener LDH-Isoenzymbestimmungsmethoden
(HAN hämolytische Anämie, Se Seminom, LeSt Leberstauung, H Hepatitis, C Coma hepaticum, UCa Uteruscarcinom, PCa Prostatacarcinom, BCa Brondhialcarcinom)
Es wurden erfaßt mit:

Krankheiten, gehörig zu:	n	Enzym- elektrophorese		Fraktionierte therm. Inaktivierung bei 56° und 65° C		HBDH- Bestimmung		Sephadex- Schnelltest		Thermische Inaktivierung bei 60° C nach Bell	
		richtig	falsch	richtig	falsch	richtig	falsch	richtig	falsch	richtig	falsch
Herzmuskeltyp (Herzinfarkt, Anämie, Seminom)	6	6	0	6	0	5	1 (HAN)	6	0	5	1 (Se)
Lebertyp (Hepatitis, Coma hepaticum, Leberstauung)	9	9	0	7	2 (LeSt)	5	4 (3 LeSt, 1 H)	6	3 (2 LeSt, 1 C)	4	5 (2 LeSt, 2 H, 1 C)
Tumortyp (maligne Tumoren, System- krankheiten)	16	15	1 (UCa)	14	2 (PCa, BCa)	mit diesen Methoden nicht differenzierbar					

Zuordnung von erhöhter LDH bei Tumorpationen. Keine dieser *Zwei-Fraktion-Methoden* ermöglicht ausreichend exakte diagnostische Hinweise auf den Tumortyp. Häufig täuscht erhöhte Tumor-LDH ein herzmuskel-typisches, seltener ein lebertypisches Verhalten vor.

Demgegenüber hat die fraktionierte thermische Inaktivierung trotz ihrer Beschränkung auf drei Fraktionen einen Aussagewert, der an die elektrophoretische Differenzierung heranreicht. Der wesentliche Vorzug dieser Methodik besteht in der Möglichkeit, auch den Tumortyp zu erfassen. Die Grenzen dieses Verfahrens liegen in der Zuordnung von Mischtypen und in der Bestimmung von Tumor-LDH bei relativ hohem LDH₁-Anteil.

Zusammenfassung

Es wurden fünf verschiedene LDH-Isoenzymbestimmungsmethoden auf ihre diagnostische Brauchbarkeit vergleichend untersucht, nämlich die Enzymelektrophorese (modifiziert nach *Wieme*), der Sephadex-Adsorptionstest (Biochemica-Test-Combination-Boehringer), die Bestimmung der HBDH-Aktivität (Mercko-Test), die thermische Inaktivierung bei 60° C (nach *Bell*) und die fraktionierte thermische Inaktivierung bei 56° C und 65° C (eigene Methode).

Aus den Ergebnissen ließen sich bisher folgende diagnostisch verwertbare Isoenzymmuster abgrenzen, die krankheitstypisch, jedoch nicht streng krankheitsspezifisch sind: Herzmuskeltyp, Lebertyp, Tumortyp und Mischtypen.

Zur Differenzierung von Herzmuskel- und Leber-LDH erwiesen sich alle Methoden als brauchbar, da der unterschiedliche Anstieg der beiden extremen Isoenzyme LDH₁ und LDH₅ von allen erfaßt wird. Schwierigkeiten bereitet die Zuordnung der Tumor-LDH mit den Methoden, die die Isoenzyme nur in zwei Fraktionen trennen. Hierzu gehören die Sephadex-Schnellmethode, die HBDH-Bestimmung und die thermische Inaktivierung bei 60° C. Tumor-LDH führt hierbei oft zu falsch positiven Herzmuskel-, seltener zu Leber-Isoenzymverteilungsmustern. Die Diagnose des Tumortyps erfordert zumindest Trennung von drei Isoenzymfraktionen und kann daher nur mit der Enzymelektrophorese und der fraktionierten thermischen Inaktivierung bei 56° C und 65° C gestellt werden.

Summary

Comparative studies of 5 different emthods for the determination of LDH isoenzymes were carried out as to their diagnostic usefulness, i. e.: enzyme electrophoresis (modified according to *Wieme*), the Sephadex adsorption test (Biochemica Test Combination Boehringer), determination of the α -hydroxybutyrate-dehydrogenase activity (Mercko Test), thermal inactivation at 60° C (according to *Bell*), and fractionated thermal inactivation at 56° C and 65° C (authors' method).

The results showed that so far the following diagnostically useful isoenzyme patterns, which are typical of a disease, however, not strictly disease-specific, can be differentiated: the cardiac muscle type, the hepatic type, the tumour type, and the mixed types.

All methods proved useful for the differentiation of cardiac muscle and hepatic LDH, since the different rise of the two extreme isoenzymes LDH₁ and LDH₅ is determined by each. The classification of tumour LDH by methods which separate the isoenzymes into only two fractions is difficult. These methods include the Sephadex rapid method, the HBDH determination, and thermal inactivation at 60° C. In this case tumour LDH often leads to false positive patterns of cardiac muscle isoenzyme distribution, less frequently to patterns of liver isoenzyme distribution. Diagnosis of the tumour type requires at least the separation of three isoenzyme fractions, and, therefore can only be established with enzyme electrophoresis and fractionated thermal inactivation at 56° C and 65° C.

Résumé

Les auteurs ont procédé à l'étude comparative de l'applicabilité diagnostique de cinq différentes méthodes de dosage des iso-enzymes de la déhydrogénase de lactate, à savoir l'électrophorèse enzymatique (modifiée suivant Wieme), le test d'adsorption Sephadex (Biochemica-Test-Combination-Boehringer), le dosage de l'activité de la déhydrogénase d' α -hydroxybutyrate (Mercko-Test), l'inactivation thermique à 60° C (suivant Bell) et l'inactivation thermique fractionnée à 56° C et 65° C (méthode personnelle).

Les résultats obtenus ont permis de délimiter jusqu'à présent les types d'iso-enzymes, diagnostiquement utilisables, caractéristiques mais non rigoureusement spécifiques pour l'affection, suivants: type myocardique, type hépatique, type tumoral et types mixtes.

Pour la différenciation de la déhydrogénase de lactate myocardique et hépatique, toutes les méthodes s'avèrent utilisables, étant donné que l'augmentation variée des deux iso-enzymes extrêmes déhydrogénase de lactate 1 et déhydrogénase de lactate 5, répondent à toutes les méthodes. La coordination de la déhydrogénase de lactate tumorale à l'aide des méthodes séparant les iso-enzymes en deux fractions seulement, cause des difficultés. En font partie la méthode instantanée Sephadex, le dosage de la déhydrogénase d' α -hydroxybutyrate et l'inactivation thermique à 60° C. La déhydrogénase de lactate tumorale fournit dans ce cas souvent de faux types de répartition positifs myocardiques et, plus rarement, d'iso-enzymes hépatiques. Le diagnostic du type tumoral exige au moins la séparation de trois fractions d'iso-enzymes et ne peut donc être posé qu'à l'aide de l'électrophorèse enzymatique et de l'inactivation thermique fractionnée à 56° C et 65° C.

Literatur

1. Amelung, D.: Fermentdiagnostik interner Erkrankungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964. — 2. Amelung, D.: Dtsch. med. Wschr. 88: 1940 (1963). — 3. Arbeitsanleitung: LDH-Isoenzyme. Fa. Boehringer u. Soehne GmbH., Mannheim-Waldhof. — 4. Arbeitsanleitung: Bestimmung der Hydroxybuttersäure-dehydrogenase. Fa. E. Merck AG., Darmstadt. — 5. Bell, L.: Amer. J. clin. Path. 40: 216 (1963). — 6. Cahn, R. D., N. O. Kaplan, L. Levin und E. Zwilling: Science 136: 962 (1962). — 7. Dubach, U. C.: Schweiz. med. Wschr. 92: 1436 (1962). — 8. Elliott, W. A. und J. A. Wilkinson: Clin. Sci. 24: 343 (1963). — 9. Fröhlich, C.: Z. klin. Chem. 3: 137 (1965). — 10. Hess, B.: Enzyme im Blutplasma, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1962. — 11. Hess, B. und S. I. Walter: Klin. Wschr. 39: 213 (1961). — 12. Markert, C. L. und F. Möller: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 45: 753 (1959). — 13. Richterich, R.: Helv. Physiol. Acta 18: C 57 (1960). — 14. Schneider, K. W., E. R. Heise und F. G. Lehmann: Med. Klinik 58: 2075 (1963). — 15. Schneider, K. W., F. G. Lehmann und E. Hornung: Med. Klinik 60: 6 (1965). — 16. Vesell, S. und G. Bearn: Clin. Invest. 40: 586 (1961). — 17. Wieme, R. J.: Clin. Chim. Acta 4: 317 (1959); 4: 46 (1959). — 18. Wörner, W.: Med. Klinik 59: 434 (1964). — 19. Wróblewski, F. und K. F. Gregory: Ann. New York Acad. Sci. 94: 912 (1961). — 20. Wüst, H., G. Berg und H. Schön: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 66: Kongreß 1960 (Wiesbaden). — 21. Wüst, H., E. Arnold und H. Schön: Klin. Wschr. 43: 500 (1965). — 22. Wüst, H.: Med. Welt S. 1798 (1965). — 23. Zondåg, H. A.: West Europ. Symp. Clin. Chem. 4: 120 (1965).

Anschriften der Verfasser: Dr. med. H. Wüst und cand. med. G. Thuss
Med. Klinik der Univ. Erlangen-Nürnberg
8520 Erlangen

Lebenslauf

Name: Gunter Thuss

geboren: 27. August 1941

in: Zwickau/Sachsen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Name der Eltern: Egon Thuss, Frieda Thuss geb. Frieß

Schulbildung: 1948 - 1955 Grundschule in Reichenbach/Vogtland

1955 - 1957 Forstfacharbeiter - Lehre

1957 - 1960 ABF der Karl-Marx-Universität Leipzig

Studiengang: WS 1961 - SS 1964 Universität Erlangen-Nürnberg

WS 1964/65 Universität Wien

SS 1965 - SS 1967 Universität Erlangen-Nürnberg

Prüfungen: Juni 1960 Reifeprüfung

August 1964 Physikum

Januar 1968 Staatsexamen

Februar 1968 Promotionsprüfung

Seit März 1968 bin ich als Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus Neustadt/Aisch tätig.

